

Suivi de la santé des loups (*Canis lupus*) : concilier conservation et santé publique



RESEARCH ARTICLE

Monitoring the health of wolves (*Canis lupus*): Integrating conservation and public health

Elisabetta Ferraro^{1,2*}, Graziana Da Rold^{1,2}, Roberto Celva², Elisa Dalla Libera², Stefania Leopardi², Giulia Simonato¹, Paola De Benedictis², Nadia Cappai³, Arianna Disegna⁴, Carlo Vittorio Citterio², Rudi Cassini¹, Federica Obber²

1 Department of Animal Medicine, Production and Health, University of Padova, Legnaro, Italy, **2** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Italy, **3** Foreste Casentinesi National Park, Pratovecchio-Stia, Italy, **4** Department of Biology, University of Padova, Padova, Italy

* elisabetta.ferraro.1@phd.unipd.it

Résumé

La population de loups gris (*Canis lupus*) est en expansion dans certaines régions d'Europe grâce à une protection juridique et à des conditions écologiques favorables. À mesure que les loups s'installent de plus en plus dans les zones urbaines et périurbaines, les interactions avec les chiens domestiques se multiplient, ce qui accroît le risque de transmission d'agents pathogènes et fait peser des menaces potentielles tant sur la conservation des loups que sur la santé publique. Cette étude a examiné l'état de santé des loups du parc national des Foreste Casentinesi (Italie) à l'aide d'un prélèvement fécal non invasif réalisé entre mai 2019 et mars 2020. Les échantillons ont été analysés génétiquement pour identifier les individus, puis soumis à un dépistage des agents pathogènes viraux, du coronavirus canin et du parvovirus, à l'aide de la PCR, du séquençage Sanger et de l'analyse phylogénétique. Des examens parasitologiques ont été réalisés à l'aide de techniques de flottation sur des échantillons entiers, et une PCR en temps réel ciblant *Echinococcus granulosus* et *E. multilocularis* a été effectuée sur des échantillons sélectionnés. Sur les 260 échantillons collectés, l'analyse génétique a permis d'identifier 80 loups individuels appartenant à 8 meutes. Un seul échantillon s'est révélé positif au coronavirus (1,2%), et aucun au parvovirus. La séquence détectée s'est avérée apparentée à des souches précédemment signalées chez des loups et des renards en Italie. La copromicroscopie a révélé une forte prévalence d'endoparasites d'intérêt vétérinaire, notamment *Eucoleus* spp. (90,0%), *Sarcocystis* spp. (42,5%), les *téniidés* (28,7 %) et les *ancylostomatidés* (26,2%). *Trichuris vulpis*, *Toxocara canis* et les coccidies ont présenté des taux de prévalence inférieurs à 2%. Les 104 échantillons testés pour *E. granulosus* ou *E. multilocularis* se sont tous révélés négatifs. Ces résultats suggèrent que, bien que les loups du FCNP hébergent couramment plusieurs parasites canins, leur rôle dans la transmission d'agents pathogènes zoonotiques semble limité. Bien que les données phylogénétiques suggèrent que les souches de coronavirus ont tendance à se regrouper au sein d'une même espèce sauvage, les données moléculaires sur les chiens domestiques restent rares. **Néanmoins**, la forte prévalence de parasites communs souligne la nécessité d'une surveillance continue tant chez les canidés sauvages que chez les carnivores domestiques. Alors que les loups occupent de plus en plus des habitats dominés par l'homme, il est essentiel de comprendre la dynamique

des maladies à l'interface entre la faune sauvage et les animaux domestiques pour mettre en place des stratégies efficaces de conservation et de santé publique.

INTRODUCTION

Le loup (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) est un grand carnivore originaire d'Europe, qui fait partie intégrante de la biodiversité et du patrimoine naturel du continent. Malgré cela, il a été poussé au bord de l'extinction dans toute l'Europe, atteignant ses niveaux de population les plus bas au cours des années 1960 et 1970. **Cependant**, de petites populations fragmentées ont survécu dans les péninsules du sud de l'Europe et dans certaines régions d'Europe de l'Est [1]. Parmi celles-ci, la sous-population de loups des Apennins (*Canis lupus italicus*, Altobello 1921) se distingue par le fait qu'elle n'a jamais complètement disparu, jouant un rôle de lien écologique entre la population du sud de l'Italie et les Alpes occidentales, facilitant ainsi le flux génétique entre les métapopulations [2]. La protection juridique (directive « Habitats » 92/43/CEE et loi Italienne 157/1992), combinée à des changements socio-écologiques tels que l'exode rural, le reboisement et l'augmentation des populations d'ongulés, a permis la réexpansion des loups à travers l'Europe, jetant les bases d'un rétablissement à grande échelle de cette espèce. À mesure que les loups s'étendent dans de nouveaux environnements, certains individus se dispersent dans des habitats fortement anthropisés, tant urbains que suburbains, qui sont considérés comme des facteurs majeurs d'exposition aux maladies pour les loups en Europe et en Amérique du Nord [3], car ces zones augmentent la fréquence des interactions entre les loups et les animaux domestiques, y compris les chiens. **En effet**, les interactions entre chiens et loups, telles que l'accouplement, les prédateurs ou le partage de ressources, pourraient faciliter la transmission de maladies infectieuses et parasitaires. Cette dynamique peut constituer une menace pour la conservation des loups et la santé publique, car les agents pathogènes canins peuvent se propager aux loups [4-6], qui peuvent alors agir comme réservoirs ou vecteurs, transmettant à leur tour des maladies aux animaux domestiques et aux humains (par exemple, le virus de la maladie de Carré et *Echinococcus granulosus*) [3].

Les maladies transmissibles chez les animaux sauvages peuvent avoir un impact sur les taux de mortalité des populations d'animaux sauvages, allant d'effets bénins contribuant au contrôle naturel de la densité à des conséquences graves, y compris, dans des cas extrêmes, l'extinction de la population [6,7]. **Cependant**, évaluer avec précision les risques réels peut s'avérer difficile [7]. Parmi les agents pathogènes qui menacent la santé des populations de loups, le **protoparvovirus des carnivores 1 (CPPV-1)** et le **coronavirus entérique canin (CCoV)** jouent un rôle majeur. Tous deux sont des agents pathogènes entériques, et leur impact peut varier en fonction de l'âge, de la sensibilité et des comorbidités des individus infectés [8-10]. Le CPPV-1 comprend différents génogroupes, parmi lesquels le parvovirus canin 2 (CPV-2) et ses variants (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) sont les agents étiologiques de la gastro-entérite hémorragique, une maladie extrêmement contagieuse présentant une morbidité et une mortalité élevées qui touche les canidés, les félidés, les mustélidés et les procyonidés ; cette large gamme d'hôtes contribue à sa propagation mondiale [10, 11]. Le CCoV est classé en deux sérotypes, le CCoV-I et le CCoV-II, en fonction de leurs protéines de spicule, chacun présentant des propriétés sérologiques différentes [12]. Il est à l'origine d'une entérite généralement bénigne mais très contagieuse chez les chiots de moins de 12 semaines, en particulier dans les environnements surpeuplés tels que les élevages et les chenils [13]. Dans certains cas, la maladie peut être mortelle, en particulier chez les animaux co-

infectés par d'autres agents pathogènes, tels que le CPV-2, l'adénovirus canin de type 1 ou le virus de la maladie de Carré [9,12]. Récemment, des sérotypes pantropiques du CCoV-IIa (pCCoV) sont apparus chez les chiens ; ils sont capables de provoquer des infections systémiques caractérisées par de la fièvre, une gastro-entérite hémorragique, des signes neurologiques et une leucopénie, pouvant entraîner la mort même en l'absence de co-infections [8,9,12,14]. La principale voie de transmission de ces deux virus est le contact direct avec des excréments ou des matériaux contaminés, car ils sont très résistants dans l'environnement [10,15,16]. Les chiens peuvent jouer un rôle significatif dans la propagation du CPV-2 au sein des populations sauvages, car les chiens errants, sauvages ou non vaccinés peuvent agir comme vecteurs. Une fois les virus introduits dans l'environnement, la transmission entre les chiens et les canidés sauvages peut se produire par contact avec les excréments, la prédation, la coprophagie ou des comportements sociaux [11]. **De plus, la persistance de l'infection chez les loups est favorisée par leur structure sociale et leurs comportements, qui facilitent la transmission fécale-orale au sein de la population** [15].

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont porté sur les infections parasitaires au sein de la population de loups Italienne, en mettant particulièrement l'accent sur les ténias et les espèces *Echinococcus* en raison de leur importance zoonotique [17-21]. *Echinococcus granulosus*, l'agent responsable de l'échinococcose kystique, est principalement associé à un cycle de transmission domestique, dans lequel les **moutons** jouent un rôle central en raison de leur forte densité de population et de leurs taux élevés de fertilité des kystes. Le chien domestique sert **d'hôte définitif principal**. À l'heure actuelle, aucune preuve claire ne vient étayer l'existence d'un véritable cycle sylvatique d'*E. granulosus* sensu stricto en Europe du Sud qui se maintiendrait indépendamment des chiens domestiques et du bétail. **En revanche, *Echinococcus multilocularis*, l'agent de l'échinococcose alvéolaire, circule principalement entre les rongeurs (principalement les campagnols) et les canidés qui s'en nourrissent.** Les renards roux (*Vulpes vulpes* L., 1758) sont les principaux **hôtes définitifs**, en raison de leurs taux d'infection élevés, de leurs habitudes alimentaires et de la densité de leur population. Les chiens domestiques, bien que très sensibles à l'infection, présentent une faible prévalence en raison d'une prédation limitée des rongeurs et d'un vermifuge occasionnel. **Les loups ont été identifiés comme hôtes dans certaines régions, mais leur préférence alimentaire pour les grands ongulés limite leur rôle dans le cycle de vie du parasite** [22].

En Italie centrale, les recherches se sont principalement concentrées sur le rôle des loups dans le cycle de transmission d'*Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1-G3), suggérant un lien potentiel avec le cycle domestique (mouton-chien) plutôt que la présence d'un cycle strictement sylvatique [21]. **Cette hypothèse est étayée par la faible prévalence de kystes fertiles chez les ongulés sauvages [19], les taux d'infection relativement faibles d'*E. granulosus* détectés chez les loups [21], et la prévalence significativement plus élevée observée chez les moutons adultes dans les régions du centre et du sud de l'Italie [23].** D'autres espèces du complexe *E. granulosus* sensu lato ont rarement été signalées en Italie [24], tandis qu'*E. multilocularis* est présent en Europe centrale et du Nord-Est, avec un seul foyer historique de circulation en Italie, dans la partie nord de la province de Bolzano [25]. Il convient de noter que Massolo et al. (2018) [26] ont détecté de manière inattendue des œufs d'*E. multilocularis* et d'*E. ortleppi* (G5) chez des loups du nord-ouest de l'Italie, soulignant la nécessité d'une surveillance et d'une recherche continues. **De plus, les loups partagent de nombreuses**

espèces de parasites intestinaux avec les chiens domestiques et d'autres canidés sauvages, ce qui implique une transmission interspécifique potentielle. **En conclusion**, une surveillance continue reste cruciale pour élucider davantage le rôle épidémiologique des loups dans le cycle de transmission de tous ces parasites.

L'objectif de cette étude était d'élargir l'enquête sur l'état de santé de la population de loups au sein du Parc national des Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna (FCNP). Pour ce faire, nous avons intégré un suivi de la population, axé sur l'estimation de l'abondance et l'identification des meutes (pour plus de détails, voir Dissegna et al., 2023 [27]), à une enquête sanitaire complète utilisant des méthodes d'échantillonnage non invasives. **Plus précisément**, nous avons mené une enquête sur la présence d'agents parasitaires et viraux, en combinant des techniques parasitologiques classiques avec des diagnostics moléculaires, en mettant particulièrement l'accent sur *E. granulosus*, *E. multilocularis*, le parvovirus canin et le coronavirus canin.

MATERIEL et METHODES

Zone d'étude

La zone d'étude comprend le Parc national des Foreste Casentinesi, du Monte Falterona et de la Campiana (FCNP), qui couvre 368 km² d'espaces protégés répartis entre les régions de Toscane et d'Émilie-Romagne, s'étendant sur les provinces d'Arezzo, de Florence et de Forlì-Cesena. L'altitude varie entre 400 et 1 658 m au-dessus du niveau de la mer et la majeure partie du territoire est recouverte de forêts, avec une végétation typique de type tempéré-subméditerranéen.

Le FCNP couvre un large éventail d'environnements, allant de zones naturelles vierges, peu ou pas touchées par l'activité humaine, à des centres urbains où l'agriculture traditionnelle, y compris l'élevage de bétail autochtone, les sites historiques et les destinations touristiques sont préservés. Malgré cela, le parc reste peu peuplé, avec seulement 2 000 habitants sur l'ensemble de sa zone protégée.

Cela crée un environnement idéal pour la faune sauvage, car cette zone est densément peuplée de grands mammifères : cerf élaphe (*Cervus elaphus* L., 1758), daim (*Dama dama* L., 1758), chevreuil (*Capreolus capreolus* L., 1758), sanglier (*Sus scrofa* L., 1758), de mouflons (*Ovis musimon* Pallas, 1762) et de loups (*Canis lupus italicus* A., 1921), ainsi qu'une grande diversité d'espèces vertébrées et invertébrées (www.parcoforestecasentinesi.it, consulté le 26 novembre 2024).

Collecte des échantillons

Des excréments de loup ont été collectés dans le cadre d'un échantillonnage génétique non invasif mené au sein du FCNP de mai 2019 à mars 2020, comme décrit dans Dissegna et al. (2023) [27]. Le FCNP a été divisé en 30 cellules à l'aide d'une grille standardisée de 5 × 5 km, avec au moins un transect par cellule. Au total, 39 transects, d'une longueur de 5 km chacun, ont été étudiés deux fois par mois pendant quatre mois, ce qui a représenté un effort d'échantillonnage total d'environ 1 600 km. Les données de géolocalisation ont été enregistrées pour chaque échantillon. Les échantillons ont été prélevés selon un protocole de prélèvement fécal par écouvillonnage à des fins d'analyse génétique, suivi du prélèvement de la totalité des selles. L'analyse génétique a été réalisée au laboratoire de l'Institut Italien pour

la protection et la recherche environnementales (ISPRA) afin de déterminer l'espèce hôte et l'identité individuelle des loups. Les détails concernant le suivi de la population sont disponibles dans Disegna et al. (2023) [27]. Les échantillons de matières fécales ont été transportés au laboratoire de Belluno de l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) pour des analyses virologiques et parasitologiques. Pour des raisons de sécurité, les échantillons ont été conservés à une température de -80°C pendant 10 jours [28], puis stockés à -20°C jusqu'à leur analyse ultérieure.

Analyse virologique

Les analyses virologiques ont été réalisées uniquement sur des échantillons correspondant à des génotypes uniques (c'est-à-dire des individus uniques) afin d'évaluer la circulation du parvovirus et du coronavirus. Lorsque plusieurs échantillons correspondaient au même individu, le dernier échantillon prélevé a été utilisé. Le CPV et le Co ont été sélectionnés comme agents pathogènes cibles car ces virus sont hautement contagieux, stables dans l'environnement et peuvent persister dans les matières fécales, ce qui en fait des candidats idéaux pour une détection non invasive.

Les échantillons ont été clarifiés à l'aide d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) traitée aux antibiotiques et les acides nucléiques ont été extraits à l'aide du kit QIAamp®Viral RNA Mini (QIAGEN, 2020). Nous avons dépisté la présence de coronavirus dans les échantillons à l'aide d'une PCR nichée à large spectre capable de détecter les membres de tous les genres connus, comme détaillé ailleurs [29]. Pour l'identification du CPV-2, une PCR en temps réel a été réalisée à l'aide du kit d'amplification QuantiFast® Pathogen PCR+ IC (QIAGEN, Hilden, Allemagne) mis en œuvre sur le CFX 96 BIO-RAD (BIO-RAD, Hercules, CA, États-Unis), comme détaillé ailleurs [30].

Les échantillons positifs ont été caractérisés plus en détail par séquençage Sanger. En particulier, un fragment partiel du gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) provenant d'un échantillon positif à la PCR nichée a été séquençé. La séquence a été soumise à GenBank sous le numéro d'accès PV661850.

Une analyse phylogénétique a été réalisée afin de comparer le virus identifié chez le loup avec des séquences similaires extraites de GenBank, en mettant particulièrement l'accent sur les souches les plus proches et celles précédemment identifiées chez des chiens et des carnivores sauvages en Italie. Un arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance a été construit à l'aide de PhyML (version 3.0), implémenté dans Seaview (Lyon, France), avec un modèle de substitution TR+G4. L'arbre a été visualisé à l'aide du logiciel en ligne iTol (<https://itol.embl.de/>) afin de mettre en évidence la relation avec les souches déposées identifiées chez divers carnivores domestiques et sauvages.

Analyse parasitologique

Tous les échantillons fécaux collectés ont été examinés par copromicroscopie classique (technique de sédimentation-flottation), à l'aide d'une solution composée de saccharose, de nitrate de sodium et d'eau (densité : 1,300) afin de détecter les œufs d'helminthes et les (oo)kystes de protozoaires. Les éléments parasitaires ont été identifiés au niveau du genre ou de l'espèce sur la base de leur morphologie [31,32].

Tous les échantillons attribuables à des génotypes d'hôtes individuels, ainsi que les échantillons fécaux qui se sont révélés positifs pour les œufs de téniides lors de la copromicroscopie (lorsque la quantité de matériel était suffisante) ont été analysés à l'aide d'un PCR duplex en temps réel pour détecter *Echinococcus granulosus* et *E. multilocularis*. Pour l'extraction d'ADN, 0,10 g de selles a été réparti en aliquotes dans des tubes Eppendorf de 2 ml. Une bille de 5 mm et 1 ml de PBS ont été ajoutés à chaque tube. Les selles ont ensuite été homogénéisées à l'aide du Tissue Lyser (QIAGEN) à 30 Hz pendant 5 minutes, puis centrifugées à 1 000 g pendant 1 minute. Enfin, 200 µl de l'échantillon et 9 µl de contrôle interne (QuantiNova Internal Control DNA - QIAGEN) ont été extraits à l'aide de l'extracteur automatisé Hamilton Microlab® STAR (HAMILTON), conformément au protocole du kit MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (QIAGEN). L'ADN extrait a été amplifié à l'aide d'un test duplex en temps réel pour l'identification d'*E. granulosus* [33] et d'*E. multilocularis* [34], en utilisant le kit QuantiNova® Pathogen+ IC (QIAGEN).

Analyse des données...

Déclaration éthique...

RESULTATS

Toutes les données pertinentes sont présentées dans les sections ci-dessous, les ensembles de données complets étant disponibles dans le Tableau S1. Au total, 261 échantillons de crottes ont été acheminés au laboratoire de Belluno, IZSVE. Parmi ceux-ci, 132 échantillons (50,6%) ont pu être génotypés avec succès, permettant d'identifier 81 génotypes uniques, correspondant à 80 loups (44 femelles, 34 mâles et 2 de sexe indéterminé) et 1 chien. L'échantillon provenant du chien a été exclu des analyses ultérieures. Le suivi de la population a permis de confirmer la présence de huit meutes au sein du FCNP (Fig. 1). De plus amples détails sur les résultats du suivi de la population sont disponibles dans Dissegna et al. (2023) [27].

Analyse virologique

Aucun des 80 échantillons testés n'était positif au parvovirus, tandis qu'un seul échantillon, provenant d'une louve de la meute H, s'est révélé positif au coronavirus (1,2% ; IC à 95% : 0,2-6,7). La séquence partielle du gène RdRp (environ 400 paires de bases) obtenue par séquençage Sanger à partir de l'amplicon positif a permis de classer cette souche comme un CCoV appartenant à l'espèce *Alphacoronavirus 1*. Notre séquence s'est regroupée avec d'autres séquences précédemment identifiées chez des loups et des renards en Italie. Elle présentait la plus forte identité nucléotidique et aminoacide (respectivement 98,3% et 100%) avec une souche de CCoV identifiée chez la même espèce hôte dans les Abruzzes (numéro d'accès GenBank OR042794). Ce groupe comprenait également une souche isolée chez un chien dans les Pouilles, qui présentait une identité de 93,41% au niveau des nucléotides et de 97,7% au niveau des acides aminés avec notre séquence (Fig. 2).

Analyse parasitologique

Au total, 260 échantillons de selles ont été analysés par copromicroscopie, 96,1% (IC à 95% : 93,1-97,9) se révélant positifs pour au moins une espèce de parasite. Une liste complète des

parasites détectés est présentée dans le **Tableau 1**, accompagnée de la proportion d'échantillons positifs (fréquence) et de la proportion d'individus positifs (prévalence).

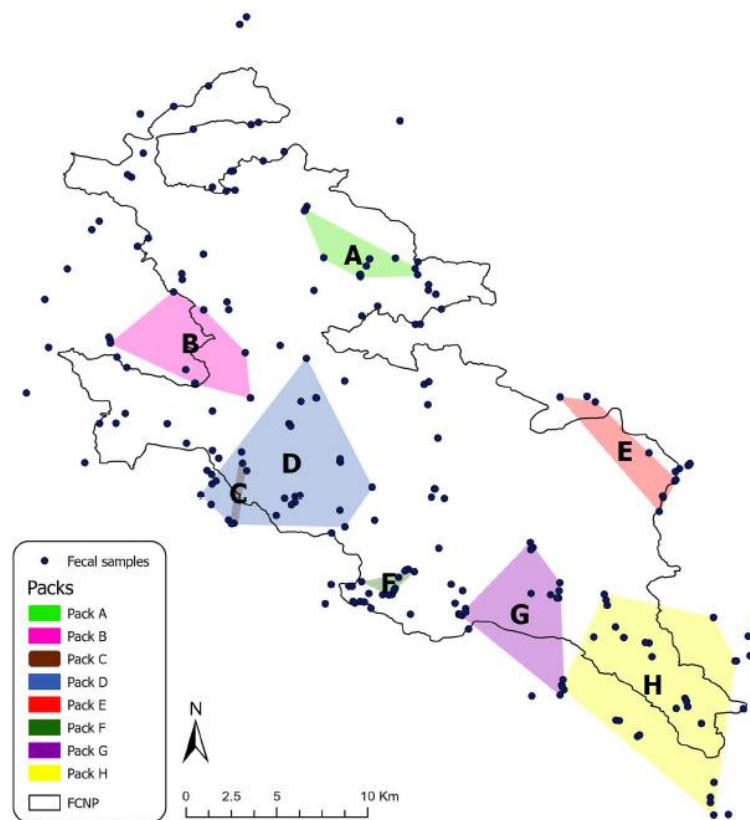


Fig. 1. Répartition des échantillons de loups et des meutes identifiées. Cette image montre la répartition des échantillons de matières fécales de loups et des meutes identifiées (d'après Dissegna et al., 2023). Pour plus de détails sur le suivi de la population, voir Dissegna et al., 2023 [27]

Il convient de noter que 176 (67,7%) des échantillons analysés présentaient des **co-infestations**, avec jusqu'à cinq espèces de parasites détectées dans un seul échantillon. Plus précisément, 121 (46,5%) échantillons se sont révélés positifs pour deux espèces, 47 (18,0%) pour trois espèces et 7 (2,7%) pour quatre espèces. *Eucoleus* spp. et le protozoaire *Sarcocystis* spp. étaient les parasites les plus répandus, avec chacun une fréquence supérieure à 40%. Les Ancylostomatidae et les Taeniidae étaient également relativement courants, avec des taux de prévalence supérieurs à 20%. Tous les autres parasites détectés présentaient une prévalence inférieure à 2%. Les détails concernant les parasites détectés dans chaque meute de loups sont présentés à la **Figure 3**.

Compte tenu de leur prévalence, les données relatives à *Eucoleus* spp., aux Ancylostomatidae, aux Taeniidae et à *Sarcocystis* spp. ont été analysées afin d'étudier l'influence de facteurs individuels (sexe), spatiaux et temporels (nord *vs.* sud du parc ; saison chaude *vs.* saison froide), mais aucune différence significative n'a été observée ($P > 0,05$).

Tous les échantillons correspondant aux génotypes des hôtes individuels ($n = 80$), ainsi que les échantillons fécaux se révélant positifs pour les œufs de téniides lors de l'examen copromicroscopique (à condition que le matériel disponible soit suffisant, $n = 24$), ont été soumis à une PCR en temps réel en duplex pour la détection d'*E. granulosus* et d'*E.*

multilocularis. Au total, 104 échantillons ont fait l'objet d'une analyse moléculaire, et aucun n'a donné de résultat positif.

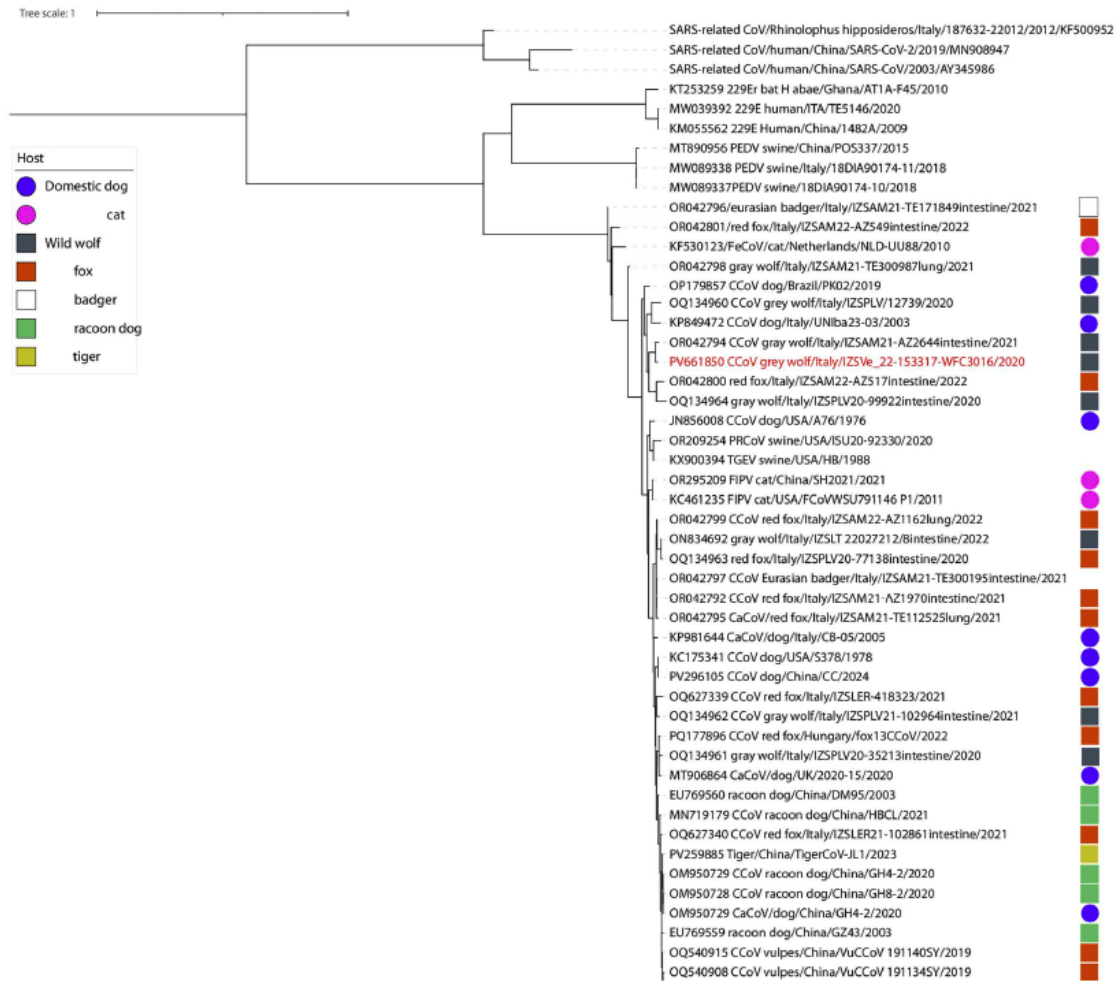


Fig. 2. Arbre phylogénétique établi par la méthode du maximum de vraisemblance (ML) à partir de séquences partielles du gène *RdRp*. La séquence originale obtenue dans le cadre de cette étude est surlignée en rouge. Les cercles et les carrés représentent respectivement les séquences identifiées chez les carnivores domestiques et sauvages, les couleurs correspondant aux espèces hôtes comme indiqué dans la légende. Plus précisément, les séquences provenant de chiens sont représentées par des cercles bleus, tandis que celles provenant de loups sont représentées par des carrés gris

Tableau 1. Fréquence et prévalence des parasites identifiés lors de l'examen copromicroscopique

Taxonomic group	Number of positive samples (Frequency %) <i>n</i> =260	Number of positive Individuals (Prevalence %) <i>n</i> =80	Confidence Interval (95%)
<i>Eucoleus</i> spp.	232 (89.2)	72 (90.0)	81.5–94.8
<i>Sarcocystis</i> spp.	109 (41.9)	34 (42.5)	32.3–53.4
<i>Ancylostomatidae</i>	73 (28.0)	21 (26.2)	17.9–36.8
<i>Taeniidae</i>	61 (23.5)	23 (28.7)	20.0–39.4
<i>Trichuris vulpis</i>	7 (2.7)	1 (1.2)	0.2–6.7
<i>Toxocara canis</i>	5 (1.9)	1 (1.2)	0.2–6.7
<i>Coccidia</i>	3 (1.1)	1 (1.2)	0.2–6.7

The table shows the number of positive samples and the number of positive individuals. The proportion of positive samples is reported as the frequency, while the proportion of positive individuals is reported as the prevalence. 95% confidence intervals are also presented.

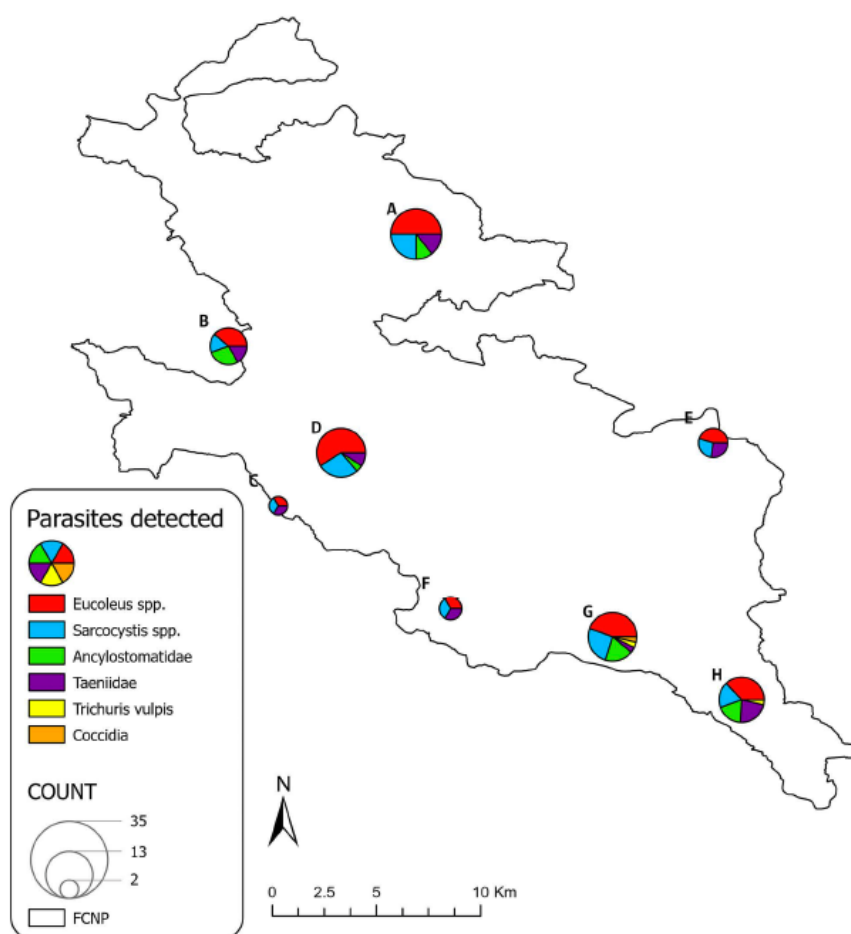


Fig. 3. Parasites détectés dans chaque meute de loups. Cette image présente la fréquence des parasites détectés dans chaque meute de loups, telle qu'identifiée par Disegna et al., 2023 [27]. La taille des graphiques circulaires est proportionnelle au nombre d'échantillons prélevés par meute

DISCUSSION

Cette étude a évalué la faune helminthique ainsi que la circulation du parvovirus et du coronavirus au sein de la population de loups du FCNP, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de la circulation des agents pathogènes chez les loups et pouvant éclairer les futures stratégies de conservation et de gestion de l'espèce.

Les maladies infectieuses peuvent jouer un rôle significatif dans la dynamique des populations d'animaux sauvages, et parmi celles qui affectent les loups, le protoparvovirus des carnivores 1 (CPPV-1) et le coronavirus entérique canin (CCo) sont particulièrement préoccupants. Dans notre étude, un seul cas positif au coronavirus (prévalence de 1,2%) a été détecté chez une louve appartenant à la meute H, ce qui suggère soit une faible prévalence au sein de la meute, soit un cas sporadique de transmission par les chiens. Ces données concordent avec des études antérieures menées en Italie, où le virus n'avait soit pas été détecté du tout, soit été trouvé à de faibles niveaux de prévalence (<10%). Dans le parc national de la Majella (MP), aucune des deux meutes ($n = 20$ échantillons de selles) n'a été testée positive au CCo [35]. **De plus**, des résultats moléculaires négatifs sur des échantillons de tissus ont été rapportés en Émilie-Romagne, en Toscane et en Calabre [36], tandis qu'une sérologie négative a été confirmée en 1996 ($n = 4$ loups) [37]. **Il est toutefois important de mentionner que la taille de l'échantillon dans cette étude aurait pu entraver l'identification du virus s'il circulait à faible prévalence, comme celui identifié sur notre territoire.** En Italie, la prévalence la plus élevée, de 8,6%, a été identifiée grâce à une étude non invasive menée sur

des échantillons de matières fécales de loups du Parc national des Abruzzes, du Latium et du Molise (ALMNP). Comme l'ont souligné les auteurs, une population de chiens errants non vaccinés coexiste dans le parc avec des meutes de loups, ce qui a pu faciliter la transmission du chien au loup [15].

Le faible taux de détection chez les loups de notre étude pourrait être lié à la survenue d'événements de spillover provenant de chiens. Bien que les données phylogénétiques disponibles tendent à soutenir le regroupement des souches au sein des espèces sauvages plutôt qu'une dispersion entre chiens et loups, il est crucial de souligner que les données moléculaires restent rares, en particulier chez les chiens. La plupart des données existantes concernent des séquences partielles de *RdRp*, qui offrent une faible résolution phylogénétique. Afin de mieux évaluer la dynamique à l'interface entre les chiens domestiques et la faune sauvage, nous recommandons une surveillance renforcée des populations de chiens domestiques et le recours au séquençage du génome complet des souches virales locales. Cette approche permettrait de distinguer plus précisément les hypothèses de transmission croisée récurrente de celles de transmission soutenue au sein de la faune sauvage, de retracer les sources d'infection et d'évaluer les risques potentiels pour les populations sauvages.

Aucun cas positif au parvovirus n'a été détecté dans notre étude, à l'instar d'un échantillonnage non invasif de matières fécales réalisé précédemment dans la même zone et portant sur un échantillon de taille similaire [38]. Cependant, des cas antérieurs d'infection par le CPV-2 ont été signalés dans le parc chez des animaux morts. Par exemple, une infection par le CPV-2 a été confirmée en 2019 chez deux louveteaux retrouvés morts, dont l'un avait été percuté par un véhicule. Afin de déterminer la cause du décès, des autopsies ont été réalisées, révélant des lésions associées à une infection par le CPV, ce qui a ensuite été confirmé par analyse moléculaire, laissant supposer que le CPV-2 était la cause du décès ou d'une maladie grave [39]. Le virus avait également été identifié auparavant dans le FCNP, dans les tissus de loups morts entre 2005 et 2007 présentant des signes de traumatisme dus à des accidents de la route [38]. Ces données confirment la faible sensibilité de l'échantillonnage fécal opportuniste pour la détection du CPV-2, très probablement parce que ce virus présente une prévalence et une excrétion maximales chez les louveteaux plutôt qu'une distribution homogène au sein de la meute. Dans des cas similaires, la surveillance passive des carcasses et le dépistage sérologique constituent de meilleurs outils pour surveiller la circulation virale, comme le montre la littérature [6, 11, 14, 36, 38]. Plus précisément, Musto (2021) [36] a identifié de l'ADN viral dans des échantillons de tissus avec des taux de détection de 45,4% en Émilie-Romagne, 29,5% en Toscane et 25,0% en Calabre.

Sur la base de matières fécales, une prévalence de 15,2% pour le CPV-2 a été enregistrée dans l'ALMNP en 2006-2007 [15]. Il est largement reconnu que les chiens domestiques peuvent encore représenter le principal réservoir du virus, même dans les pays où les taux de vaccination canine sont élevés, comme l'Italie. Dans ces pays, le commerce légal et illégal de chiens et d'autres carnivores est probablement responsable de l'introduction récurrente de nouvelles souches et pourrait constituer un risque majeur pour la santé de la faune sauvage [11,40].

Du point de vue de la santé publique, les Taeniidae constituent la famille parasitaire la plus importante chez les canidés sauvages, car elle comprend les espèces d'*Echinococcus* et certaines espèces de *Taenia*. Les loups servent d'hôtes définitifs, contribuant ainsi à la dissémination de ces parasites dans l'environnement. Dans notre enquête, des œufs de taeniidés ont été détectés avec une prévalence de 28,7%. Par rapport à d'autres études menées dans le FCNP, nos résultats ont montré une valeur considérablement plus élevée que les 7,2% rapportés par Ambrogi et al. (2019) [38], mais inférieure aux 61,1% enregistrés par Poglayen et al. (2017) [21]. **Cependant, notre résultat pourrait être sous-estimé en raison de la faible sensibilité de la copromicroscopie pour la détection des œufs de ténies et de l'excrétion intermittente d'œufs dans les selles** [41].

Conformément à la méthode proposée par Obber et al. (2022) [42] pour augmenter la sensibilité de la détection d'*E. granulosus* et d'*E. multilocularis* dans le contexte d'une faible prévalence attendue, nous avons réalisé un test PCR duplex en temps réel sur des échantillons attribuables à des génotypes d'hôtes individuels – indépendamment de leurs résultats copromicroscopiques – ainsi que sur ceux qui se sont révélés positifs pour les œufs de ténies lors de la copromicroscopie. Cette approche visait à évaluer approximativement la prévalence (c'est-à-dire le pourcentage de résultats positifs parmi les échantillons génotypés) et à augmenter la probabilité de détecter le parasite s'il était présent, y compris dans les échantillons non génotypés. Conformément aux conclusions de Poglayen et al. (2017) [21], aucun cas d'*E. multilocularis* n'a été détecté. **En revanche, alors que Poglayen et al. ont rapporté une faible prévalence d'*E. granulosus* (G1-G3) (5,5%), nous n'avons détecté aucun cas.** Au moins deux décennies se sont écoulées depuis le prélèvement des échantillons analysés dans l'étude de Poglayen, et nos résultats confirment que les loups de ce parc national ne présentent pas de risque significatif pour ce parasite zoonotique, et qu'aucun cycle sylvestre ne semble exister. La faible prévalence antérieure d'*E. granulosus* (G1-G3) chez les loups pouvait être liée à la prédation sur les animaux domestiques ; **par conséquent**, nos résultats pourraient indiquer que les mesures de gestion du parc ont efficacement minimisé l'incidence déjà faible de la prédation des loups sur le bétail. **En conséquence**, le régime alimentaire des loups dans ce parc repose désormais principalement sur des ongulés sauvages, qui semblent exempts d'infection à *Echinococcus*. Nous n'avons pas effectué d'analyse moléculaire pour caractériser plus en détail les œufs de ténies. Dans l'étude menée par Poglayen et al. (2017), la présence de *Taenia hydatigena* (40,7%), *T. krabbel* (22,2%), *T. polyacantha* (1,8%), ainsi que d'*Echinococcus granulosus* (5,5%), a été rapportée. Compte tenu de leur cycle de vie indirect, la présence de ces ténies est étroitement liée au régime alimentaire des loups. À l'exception de *T. hydatigena*, qui est associé à la fois aux ongulés domestiques et sauvages, toutes les autres espèces de ténies précédemment identifiées font partie d'un cycle sylvestre [43,44]. Cela suggère en outre que les loups de cette région se nourrissent principalement d'animaux sauvages. Une surveillance continue des loups est souhaitable pour mieux comprendre la dynamique écologique de l'espèce et de ses parasites à l'ère des changements sociaux et climatiques. Cette nécessité est encore renforcée par des données récentes de Cafiero et al. (2025) [45], qui ont signalé la détection de loups positifs au génome d'*E. multilocularis* dans le nord de la Toscane.

Parmi les espèces d'helminthes présentant un intérêt vétérinaire, le genre le plus fréquemment détecté dans notre étude (prévalence de 90,0%) était *Eucolus* spp. (synonyme : *Capillaria* spp.), un groupe de nématodes cosmopolites affectant principalement les canidés.

Eucoleus aerophilus (syn. *Capillaria aerophila*) et *Eucoleus boehmi* (syn. *Capillaria boehmi*) sont respectivement les capillariidés bronchiques et nasaux, dont les œufs se trouvent dans les selles de l'hôte. Le cycle de vie de ces nématodes reste incertain ; on suppose que les vers de terre pourraient servir d'hôtes intermédiaires ou paraténiques, mais l'ingestion directe de larves infectieuses de troisième stade contenues dans les œufs ne peut être exclue [46,47]. Les œufs de capillariidés se sont dégradés après avoir été conservés à -80°C, empêchant ainsi la distinction entre les deux espèces, *E. boehmi* et *E. aerophilus* [46]. Il est intéressant de noter que ce genre n'est généralement pas considéré comme le parasite le plus répandu chez les loups [43]. Des taux de prévalence aussi élevés n'ont pas été rapportés dans d'autres études Européennes en dehors de l'Italie [48,49], la prévalence la plus élevée enregistrée en Europe étant de 30% chez des loups en captivité en Allemagne [50].

En Italie, les taux de prévalence chez les loups varient selon les régions, allant de 80% pour *E. boehmi* et 20% pour *E. aerophilus* dans l'ALMNP [51], 67% et 32% pour les mêmes espèces dans le nord de la Toscane [52], à 35 % pour *E. aerophilus* dans le MP [35], et jusqu'à 2,3% pour *Eucoleus* spp. dans le Piémont [53]. Une étude récente comparant les nématodes chez les loups et les renards dans des environnements à la fois anthropisés (province de Pise, Italie) et naturels (réserve naturelle de Monterufoli Caselli, province de Pise, Italie, et FCNP) a révélé que les capillariidés étaient nettement plus fréquents chez les loups (~60%) que chez les renards (~30%) dans les deux contextes [54]. Ces résultats soulignent le rôle potentiel des loups dans le cycle de transmission de ces parasites, le renard roux ayant traditionnellement été considéré comme le principal réservoir en Europe. Compte tenu de ces résultats, les loups pourraient contribuer de manière significative à la contamination de l'environnement par des œufs de capillariidés, posant un risque d'infection pour d'autres animaux, y compris les chiens et les chats domestiques. De plus, *E. aerophilus* présente un risque zoonotique, car il est l'agent responsable de la capillariose pulmonaire humaine [55].

Les Ancylostomatidae ont été détectés avec une prévalence de 26,2%. Cependant, ce chiffre pourrait être sous-estimé, car leurs œufs sont moins résistants aux conditions défavorables, telles que la congélation à -80°C et le dégel. Les Ancylostomatidae comptent parmi les parasites les plus fréquemment détectés chez les loups, avec des taux de prévalence rapportés dépassant 60% [43]. *Uncinaria stenocephala* est l'espèce la plus répandue en Italie, avec des taux de prévalence rapportés de 67% contre 16% pour *Ancylostoma caninum* [56] et de 26,2% contre 7,1% dans le Piémont [53]. Plus récemment, Perrucci et al. (2023) [54] ont constaté une prévalence des ankylostomes de 53,8% dans des échantillons de loups provenant de zones naturelles, ce qui suggère une prévalence plus élevée chez les loups de ces environnements par rapport à ceux des zones anthropisées. Cette différence est probablement due à des conditions plus favorables au développement des œufs, telles qu'une humidité plus élevée et l'ombre, qui facilitent la transmission directe.

Dans notre étude, *Trichuris vulpis* et *Toxocara canis* ont été détectés de manière sporadique, avec une prévalence de 1,2% chacun. La prévalence de *T. vulpis* est conforme aux valeurs rapportées chez d'autres canidés sauvages en Italie, tels que les renards [57,58]. En revanche, la prévalence de *T. canis* pourrait être sous-estimée en raison d'un biais d'échantillonnage en faveur des loups adultes, car les échantillons fécaux collectés le long des transects sont principalement associés au comportement de marquage olfactif des adultes. En effet, les infections par les ascarides sont généralement plus courantes chez les juvéniles, en raison des

voies de transmission verticale [59]. **De plus**, le rôle des hôtes paraténiques est central dans l'épidémiologie de *T. canis*, une prévalence beaucoup plus élevée étant rapportée chez les canidés qui se nourrissent de petits vertébrés [54,57,60,61].

Parmi les **protozoaires**, nous avons détecté *Sarcocystis* spp. avec une prévalence élevée de 42,5%. *Sarcocystis* spp. est un protozoaire apicomplexe dont le cycle implique généralement une relation prédateur-proie, dans laquelle les herbivores (ou omnivores) servent d'hôtes intermédiaires, développant des kystes dans le tissu musculaire (sarcocystes), et les carnivores (ou omnivores) d'hôtes définitifs, excréant des sporocystes dans leurs excréments, qui peuvent contaminer la nourriture ou l'eau [62]. **Par conséquent**, la forte prévalence de *Sarcocystis* spp. détectée dans notre étude pourrait être étroitement liée au régime alimentaire des loups dans le FCNP. Il a été observé que lorsque les loups se nourrissent principalement d'ongulés sauvages, la charge en *Sarcocystis* spp. augmente, tandis qu'un régime alimentaire plus varié contribue à réduire la charge parasitaire [51]. En Allemagne, où les loups se nourrissent principalement de daims et de sangliers, les taux de prévalence atteignent jusqu'à 95%. Des analyses moléculaires ont identifié 12 espèces potentielles de *Sarcocystis*, les plus répandues (*S. taeniata*, *S. gracilis*, *S. capreolicanis*, *S. grueneri*, *S. tenella*, *S. miescheriana* et *S. cruzi*) étant liées aux hôtes intermédiaires présents en Allemagne [63]. La présence de *Sarcocystis* spp. chez les loups en Italie reste peu étudiée. **En effet**, des analyses moléculaires sont nécessaires pour l'identification spécifique de *Sarcocystis*, ce qui permettrait de mieux comprendre à la fois la relation prédateur-proie et les risques potentiels pour la santé publique. **En revanche**, la recherche sur les hôtes intermédiaires est plus approfondie. Une prévalence élevée de *S. miescheriana* et une présence sporadique de *S. suihominis* sont bien documentées chez les sangliers [64-68]. Des analyses moléculaires ont également identifié plusieurs espèces de *Sarcocystis* chez les chevreuils (par exemple, *S. gracilis*, *S. silva*, *S. capreolicanis* et *S. linearis* [69]. D'après nos résultats, il est probable que cette parasitose négligée soit également présente chez les ongulés au sein du FCNP, et ses implications potentielles pour la santé publique ne doivent pas être sous-estimées. Des coccidies ont été détectées à faible prévalence (1,2%) dans cette étude, contrairement à une enquête précédente menée dans la même région [38]. D'autres études suggèrent que les canidés sauvages pourraient jouer un rôle dans le maintien de ces parasites dans l'environnement et leur transmission tant à la faune sauvage qu'aux animaux domestiques [54]. L'impact pathogène chez les loups, en particulier les juvéniles, reste incertain et mérite des investigations supplémentaires, compte tenu des cas documentés de mortalité associée aux coccidies [70].

En conclusion, nous avons étudié l'état de santé de la population de loups dans le FCNP. Nous avons constaté une faible prévalence d'excrétion de coronavirus chez ces loups et la séquence détectée s'est avérée apparentée à d'autres provenant de canidés sauvages d'Italie. **Cependant**, les données moléculaires sur les chiens domestiques restent limitées. Cela souligne la nécessité d'une surveillance chez cette espèce, afin de suivre plus précisément la transmission des agents pathogènes au sein de la faune sauvage et des animaux domestiques, de retracer les infections et d'évaluer les risques potentiels pour la conservation. **Du point de vue de la santé publique**, nos résultats indiquent que les loups du FCNP ne représentent pas un risque significatif de transmission de parasites zoonotiques, tels que *Echinococcus* spp. **Néanmoins**, le rôle des loups dans l'épidémiologie d'autres parasites d'importance vétérinaire doit être souligné. L'analyse copromicroscopique s'est révélée être un outil précieux et non invasif pour surveiller cette population sauvage, fournissant des informations

utiles sur les principaux genres de parasites circulant parmi ces loups. Cependant, sa faible sensibilité envers certains groupes de parasites (par exemple, les ténidés) doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats. **Néanmoins**, l'intégration de méthodes moléculaires permet une identification plus précise des agents pathogènes impliqués. La combinaison de l'analyse nécropsique des loups décédés et de l'examen copromicroscopique d'échantillons fécaux prélevés dans l'environnement améliorerait considérablement les efforts de surveillance. Cette approche est particulièrement utile car l'excrétion fécale de certains agents pathogènes ne se produit qu'à des stades spécifiques de l'infection, ce qui peut conduire à des faux négatifs si l'on se fie uniquement aux analyses fécales. En utilisant ces deux méthodes, il est possible de détecter les parasites excrétés dans les selles à un coût relativement faible grâce à l'analyse copromicroscopique, tandis que l'autopsie peut fournir des informations cruciales sur l'exposition à des agents pathogènes qui ne sont pas systématiquement détectables dans les selles, tels que les parvovirus ou les coronavirus. Une **approche intégrée** offre une compréhension plus complète de l'état de santé des canidés sauvages, avec des implications importantes tant pour la conservation de la faune sauvage que pour la santé publique.

References

1. Boitani L. Wolf conservation and recovery. *Wolf Conservation and Recovery*. University of Chicago Press. 2010. 317–40.
2. Fabbri E, Miquel C, Lucchini V, Santini A, Caniglia R, Duchamp C, et al. From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Mol Ecol*. 2007;16(8):1661–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03262.x> PMID: 17402981
3. Marucco F, Pilgrim KL, Avanzinelli E, Schwartz MK, Rossi L. Wolf Dispersal Patterns in the Italian Alps and Implications for Wildlife Diseases Spreading. *Animals (Basel)*. 2022;12(10):1260. <https://doi.org/10.3390/ani12101260> PMID: 35625106
4. Balboni A, Urbani L, Delogu M, Musto C, Fontana MC, Meriardi G, et al. Integrated Use of Molecular Techniques to Detect and Genetically Characterise DNA Viruses in Italian Wolves (*Canis lupus italicus*). *Animals (Basel)*. 2021;11(8):2198. <https://doi.org/10.3390/ani11082198> PMID: 34438655
5. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science*. 2000;287(5452):443–9. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443> PMID: 10642539
6. Millán J, López-Bao JV, García EJ, Oleaga Á, Llaneza L, Palacios V, et al. Patterns of Exposure of Iberian Wolves (*Canis lupus*) to Canine Viruses in Human-Dominated Landscapes. *Ecohealth*. 2016;13(1):123–34. <https://doi.org/10.1007/s10393-015-1074-8> PMID: 26589403
7. Guberti V, Stancampiano L, Ferrari N. Surveillance, monitoring and survey of wildlife diseases: a public health and conservation approach. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*. 2014;25(1).
8. Haake C, Cook S, Pusterla N, Murphy B. Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. *Viruses*. 2020;12(9):1023. <https://doi.org/10.3390/v12091023> PMID: 32933150
9. Licita BN, Duhamel GE, Whittaker GR. Canine enteric coronaviruses: emerging viral pathogens with distinct recombinant spike proteins. *Viruses*. 2014;6(8):363–76. <https://doi.org/10.3390/v6083363> PMID: 25153347
10. Miranda C, Thompson G. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *J Gen Virol*. 2016;97(9):2043–57. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540> PMID: 27389721
11. Calatayud O, Esperón F, Velarde R, Oleaga Á, Llaneza L, Ribas A, et al. Genetic characterization of Carnivore Parvoviruses in Spanish wildlife reveals domestic dog and cat-related sequences. *Transbound Emerg Dis*. 2020;67(2):626–34. <https://doi.org/10.1111/tbed.13378> PMID: 31581349
12. Decaro N, Buonavoglia C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Veterinary microbiology*. 2008;132(3–4).
13. Stavisky J, Pinchbeck GL, German AJ, Dawson S, Gaskell RM, Ryvar R, et al. Prevalence of canine enteric coronavirus in a cross-sectional survey of dogs presenting at veterinary practices. *Vet Microbiol*. 2010;140(1–2):18–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.012> PMID: 19647379
14. Alfano F, Dowgier G, Valentino MP, Gallero G, Tinelli A, Nicola D, et al. Identification of Pantropic Canine Coronavirus in a Wolf (*Canis lupus italicus*) in Italy. *J Wildl Dis*. 2019;55(2):504–8. <https://doi.org/10.7589/2018-07-182> PMID: 30376395
15. Molnar B, Duchamp C, Möstl K, Diehl P-A, Betschart B. Comparative survey of canine parvovirus, canine distemper virus and canine enteric coronavirus infection in free-ranging wolves of central Italy and south-eastern France. *Eur J Wildl Res*. 2014;60(4):613–24. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0825-0> PMID: 32214941
16. Pratelli A. Canine coronavirus inactivation with physical and chemical agents. *Vet J*. 2008;177(1):71–9. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.03.019> PMID: 17513145
17. Crotti S, Spina S, Cruciani D, Bonelli P, Felici A, Gavaudan S, et al. Tapeworms detected in wolf populations in Central Italy (Umbria and Marche regions): A long-term study. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2023;21:11–6. <https://doi.org/10.1016/j.jippaw.2023.03.007> PMID: 37025622
18. Gori F, Armua-Fernandez MT, Milanesi P, Serafini M, Magi M, Deplazes P, et al. The occurrence of taeniids of wolves in Liguria (northern Italy). *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2015;4(2):252–5. <https://doi.org/10.1016/j.jippaw.2015.04.005> PMID: 26042204
19. Guberti V, Bolognini M, Lanfranchi P, Battelli G. *Echinococcus granulosus* in the wolf in Italy. *Parassitologia*. 2004;46(4):425–7. PMID: 16044708
20. Macchioni F, Coppola F, Furzi F, Gabrielli S, Baldanti S, Boni CB, et al. Taeniid cestodes in a wolf pack living in a highly anthropic hilly agro-ecosystem. *Parasite*. 2021;28:10. <https://doi.org/10.1051/parasite/2021008> PMID: 33544075
21. Poglayen G, Gori F, Morandi B, Galuppi R, Fabbri E, Caniglia R, et al. Italian wolves (*Canis lupus italicus* Altobello, 1921) and molecular detection of taeniids in the Foreste Casentinesi National Park, Northern Italian Apennines. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2017;6(1):1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jippaw.2017.01.001> PMID: 28180084

22. Romig T, Deplazes P, Jenkins D, Giraudoux P, Massolo A, Craig PS, et al. Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. *Adv Parasitol.* 2017;95:213–314. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.002> PMID: 28131364
23. Tamarozzi F, Legnardi M, Fittipaldo A, Drigo M, Cassini R. Epidemiological distribution of *Echinococcus granulosus* s.l. infection in human and domestic animal hosts in European Mediterranean and Balkan countries: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(8):e0008519. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008519> PMID: 32776936
24. Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, Torgerson PR, Harandi MF, Romig T. Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. In: Thompson RCA, Deplazes P, Lymbery AJ. *Advances in Parasitology*. Academic Press. 2017. 315–493.
25. Citterio CV, Obber F, Trevisiol K, Dellamaria D, Celva R, Bregoli M. *Echinococcus multilocularis* and other cestodes in red foxes (*Vulpes vulpes*) of northeast Italy, 2012–2018. *Parasit Vectors.* 2021;14(1):29.
26. Massolo A, Valli D, Wassermann M, Cavallero S, D'Amelio S, Meriggi A, et al. Unexpected *Echinococcus multilocularis* infections in shepherd dogs and wolves in south-western Italian Alps: A new endemic area? *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2018;7(3):309–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.08.001> PMID: 30175043
27. Dissegna A, Rota M, Basile S, Fusco G, Mencucci M, Cappai N, et al. How to Choose? Comparing Different Methods to Count Wolf Packs in a Protected Area of the Northern Apennines. *Genes (Basel).* 2023;14(4):932. <https://doi.org/10.3390/genes14040932> PMID: 37107690
28. Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS, Organization WH. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health. 2001. <https://iris.who.int/handle/10665/42427>
29. Drzewnioková P, Festa F, Panzarini V, Lelli D, Moreno A, Zecchin B, et al. Best Molecular Tools to Investigate Coronavirus Diversity in Mammals: A Comparison. *Viruses.* 2021;13(10):1975. <https://doi.org/10.3390/v13101975> PMID: 34696405
30. Carrino M, Tassoni L, Campalio M, Cavicchio L, Mion M, Corò M, et al. Molecular Investigation of Recent Canine Parvovirus-2 (CPV-2) in Italy Revealed Distinct Clustering. *Viruses.* 2022;14(5):917. <https://doi.org/10.3390/v14050917> PMID: 35632660
31. Taylor MA, Coop RL, Wall RL. *Veterinary parasitology*. 4 ed. Chichester, West Sussex, UK; Ames, Iowa, USA: John Wiley & Sons, Ltd. 2016.
32. Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ. *Diagnosing helminthiasis by coprological examination*. Third ed. Beerse, Belgium: Janssen Research Foundation. 2003.
33. Maksimov P, Bergmann H, Wassermann M, Romig T, Gottstein B, Casulli A, et al. Species Detection within the *Echinococcus granulosus* sensu lato Complex by Novel Probe-Based Real-Time PCRs. *Pathogens.* 2020;9(10):791. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100791> PMID: 32993077
34. Knapp J, Millon L, Mouzon L, Umhang G, Raoul F, Ali ZS, et al. Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools. *Vet Parasitol.* 2014;201(1–2):40–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.023> PMID: 24484767
35. Di Francesco CE, Smoglica C, Paoletti B, Angelucci S, Innocenti M, Antonucci A, et al. Detection of selected pathogens in Apennine wolf (*Canis lupus italicus*) by a non-invasive GPS-based telemetry sampling of two packs from Majella National Park, Italy. *Eur J Wildl Res.* 2019;65(6):84. <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1326-y> PMID: 32214950
36. Musto C. Circulation of canine viruses in free-ranging Italian wolves (*Canis lupus italicus*) from three Italian regions. *Alma Mater Studiorum - Università di Bologna.* 2021. <https://amsdottorato.unibo.it/id/eprint/9906/>
37. Fico R. Indagine sulla presenza di anticorpi contro il virus della parvovirosi canina, del cimurro, dell'epatite infettiva del cane, il coronavirus del cane e l'Ehrlichia canis in sieri di lupo (*Canis lupus*) dell'Italia Centrale. 1996.
38. Ambrogi C, Ragagli C, Decaro N, Ferroglio E, Mencucci M, Apollonio M. Health survey on the wolf population in Tuscany, Italy. *Hystrix It J Mamm.* 2019;30(1):19–23.
39. Deni D. Relazione attività triennio 2017–2019. Convenzione di collaborazione con Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana per la gestione della fauna selvatica nel territorio del Parco nazionale delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona, Campigna. 2020.
40. Leopardi S, Milani A, Cocchi M, Bregoli M, Schivo A, Leardini S, et al. Carnivore protoparvovirus 1 (CPV-2 and FPV) Circulating in Wild Carnivores and in Puppies Illegally Imported into North-Eastern Italy. *Viruses.* 2022;14(12):2612. <https://doi.org/10.3390/v14122612> PMID: 36560617
41. Marchiori E, Obber F, Celva R, Marcer F, Danesi P, Maurizio A, et al. Comparing copromicroscopy to intestinal scraping to monitor red fox intestinal helminths with zoonotic and veterinary importance. *Front Vet Sci.* 2023;9:1085996. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1085996> PMID: 36713854
42. Obber F, Celva R, Da Rold G, Trevisiol K, Ravagnan S, Danesi P, et al. A highly endemic area of *Echinococcus multilocularis* identified through a comparative re-assessment of prevalence in the red fox (*Vulpes vulpes*), Alto Adige (Italy: 2019–2020). *PLoS One.* 2022;17(5):e0268045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268045> PMID: 35511816
43. Craig HL, Craig PS. Helminth parasites of wolves (*Canis lupus*): a species list and an analysis of published prevalence studies in Nearctic and Palearctic populations. *J Helminthol.* 2005;79(2):95–103. <https://doi.org/10.1079/joh2005282> PMID: 15946392
44. Formenti N, Chiari M, Trogu T, Gaffuri A, Garbarino C, Boniotti MB, et al. Molecular identification of cryptic cysticercosis: *Taenia ovis* krabbei in wild intermediate and domestic definitive hosts. *J Helminthol.* 2018;92(2):203–9. <https://doi.org/10.1017/S0022149X17000177> PMID: 28349853
45. Cafiero SA, Petroni L, Natucci L, Tomassini O, Romig T, Wassermann M, et al. New evidence from the northern Apennines, Italy, suggests a southward expansion of *Echinococcus multilocularis* range in Europe. *Sci Rep.* 2025;15(1):7353. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-91596-7> PMID: 40025062

46. Gillis-Germitsch N, Müller S, Gori F, Schnyder M. *Capillaria boehmi* (syn. *Eucoleus boehmi*): Challenging treatment of a rarely diagnosed nasal nematode in dogs and high prevalence in Swiss foxes. *Vet Parasitol.* 2020;281:109103. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109103> PMID: [32299042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32299042/)
47. Samorek-Pieróg M, Cencok T, Łabuć E, Pac-Sosińska M, Pieróg M, Korpysa-Dzirba W. Occurrence of *Eucoleus aerophilus* in wild and domestic animals: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors.* 2023;16:245.
48. Segovia JM, Torres J, Miquel J, Llana L, Feliu C. Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. *J Helminthol.* 2001;75(2):183–92. <https://doi.org/10.1079/joh200152> PMID: [11520444](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11520444/)
49. Szafrańska E, Wasielewski O, Bereszyński A. A faecal analysis of helminth infections in wild and captive wolves, *Canis lupus L.*, in Poland. *J Helminthol.* 2010;84(4):415–9. <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000106> PMID: [20236557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20236557/)
50. Bindke JD, Springer A, Janecek-Erfurth E, Böer M, Strube C. Helminth infections of wild European gray wolves (*Canis lupus Linnaeus*, 1758) in Lower Saxony, Germany, and comparison to captive wolves. *Parasitology research.* 2019;118(2).
51. Molnar B, Ciucci P, Mastrantonio G, Betschart B. Correlates of parasites and pseudoparasites in wolves (*Canis lupus*) across continents: A comparison among Yellowstone (USA), Abruzzo (IT) and Mercantour (FR) national parks. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2019;10:196–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.09.002> PMID: [31667082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31667082/)
52. Cafiero SA, Petroni L, Natucci L, Casale L, Raffaelli M, Baldacci D, et al. Parasite diversity in grey wolves (*Canis lupus*) from Tuscany, central Italy: a copromicroscopical investigation. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2025;27:101092. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2025.101092> PMID: [40606262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40606262/)
53. de Macedo MRP, Zanet S, Bruno S, Tolosano A, Marucco F, Rossi L, et al. Gastrointestinal helminths of wolves (*Canis lupus Linnaeus*, 1758) in Piedmont, north-western Italy. *J Helminthol.* 2019;94:e88.
54. Perrucci S, Maestrini M, Coppola F, Di Marco M, Rosso AD, Pacini MI, et al. Gray Wolf (*Canis lupus italicus*) and Red Fox (*Vulpes vulpes*) Parasite Survey in Anthropized and Natural Areas of Central Italy. *Vet Sci.* 2023;10(2):108.
55. Lalosević D, Lalosević V, Klem I, Stanojević-Jovanović D, Pozio E. Pulmonary capillariasis mimicking bronchial carcinoma. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(1):14–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.14> PMID: [18187778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18187778/)
56. Guberti V, Stancampiano L, Francisci F. Intestinal helminth parasite community in wolves (*Canis lupus*) in Italy. *Parassitologia.* 1993;35(1–3):59–65. PMID: [8065823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8065823/)
57. Di Cerbo AR, Manfredi MT, Bregoli M, Milone NF, Cova M. Wild carnivores as source of zoonotic helminths in north-eastern Italy. *Helminthologia.* 2008;45(1):13–9.
58. Magi M, Macchioni F, Dell'omodarme M, Prati MC, Calderini P, Gabrielli S, et al. Endoparasites of red fox (*Vulpes vulpes*) in central Italy. *J Wildl Dis.* 2009;45(3):881–5. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.3.881> PMID: [19617506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19617506/)
59. Kloch A, Bednarska M, Bajer A. Intestinal macro- and microparasites of wolves (*Canis lupus L.*) from north-eastern Poland recovered by coprological study. *Ann Agric Environ Med.* 2005;12(2):237–45. PMID: [16457480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16457480/)
60. Flocchi A, Gustinelli A, Gelmini L, Rugna G, Renzi M, Fontana MC, et al. Helminth parasites of the red fox *Vulpes vulpes* (L., 1758) and the wolf *Canis lupus italicus* Altobello, 1921 in Emilia-Romagna, Italy. *Italian Journal of Zoology.* 2016;83(4):503–13. <https://doi.org/10.1080/11250003.2016.1249966>
61. Walndok P, Raue K, Grilo ML, Siebert U, Strube C. Predators in northern Germany are reservoirs for parasites of One Health concern. *Parasitol Res.* 2021;120(12):4229–39. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07073-3> PMID: [33547507](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33547507/)
62. Guardone L, Armani A, Mancianti F, Ferroglio E. A review on *Alaria alata*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in mammalian game meat consumed in Europe: epidemiology, risk management and future directions. *Animals (Basel).* 2022;12(3):263.
63. Lesniak I, Heckmann I, Heitlinger E, Szentiks CA, Nowak C, Harms V, et al. Population expansion and individual age affect endoparasite richness and diversity in a recolonising large carnivore population. *Sci Rep.* 2017;7:41730. <https://doi.org/10.1038/srep41730> PMID: [28128348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28128348/)
64. Gaglio G, Ferrara MC, Giannetto S, Poglajen G. Survey on wild boar (*Sus scrofa*) sarcocystosis in Sicily (Italy). *Large Animal Review.* 2012;18(2):71–3.
65. Gazzonis AL, Gjerde B, Villa L, Minazzi S, Zanzani SA, Riccaboni P, et al. Prevalence and molecular characterisation of *Sarcocystis miescheriana* and *Sarcocystis suis hominis* in wild boars (*Sus scrofa*) in Italy. *Parasitol Res.* 2019;118(4):1271–87. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06249-2> PMID: [30788573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30788573/)
66. Leoni A, Scala A, Garippa G, Pirini S, Sanna P. La sarcosporidiosi del cinghiale (*Sus scrofa meridionalis*) in Sardegna: aspetti epidemiologici, morfo- ultrastrutturali e anatomo- istopatologici. In Teramo; 1995. 17–22.
67. Pacifico L, Rubiola S, Buono F, Sgadari M, D'Alessio N, Scarcelli S. Molecular differentiation of *Sarcocystis miescheriana* and *Sarcocystis suis hominis* using a new multiplex PCR targeting the mtDNA *cox1* gene in wild boars in southern Italy. *Research in Veterinary Science.* 2023;164:105039.
68. Piergili-Fioretti D, Moretti A, Polidori GA, Taddei G. Saggi su alcune infezioni zoonosiche nei cinghiali della regione umbra. *Praxis.* 1985;4(8):11–3.
69. Gjerde B, Giacomelli S, Bianchi A, Bertolotti I, Mondani H, Gibelli LR. Morphological and molecular characterization of four *Sarcocystis* spp., including *Sarcocystis linearis* n. sp., from roe deer (*Capreolus capreolus*) in Italy. *Parasitol Res.* 2017;116(4):1317–38. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5410-5> PMID: [28255918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28255918/)
70. Mech LD, Kurtz HJ. First record of coccidiosis in Wolves, *Canis lupus*. *The Canadian field-naturalist.* 1999;113(2):305–6. <https://doi.org/10.596/2p.358582>